

B3

**HIV-RESISTANT RECOMBINED MODIFIED ANTIBODY AND METHOD FOR PREPARING MODIFIED ANTIBODY****Publication number:** JP4141095**Publication date:** 1992-05-14**Inventor:** MAEDA HIROAKI; MATSUSHITA SHUZO; EDA YASUYUKI; KURUMI KAZUHIKO; TOKIYOSHI YUKIO; MARII EMU BENDEITSUKU**Applicant:** CHEMO SERO THERAPEUT RES INST**Classification:**

**- international:** G01N33/569; A61K39/395; A61P31/12; C07K14/00; C07K14/005; C07K14/155; C07K14/195; C07K16/00; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/577; C12R1/91; G01N33/569; A61K39/395; A61P31/00; C07K14/00; C07K14/005; C07K14/195; C07K16/00; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/577; (IPC1-7): A61K39/395; C07K15/04; C07K15/12; C07K15/28; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/569; G01N33/577

**- European:****Application number:** JP19900266091 19901002**Priority number(s):** JP19900266091 19901002

Report a data error here

**Abstract of JP4141095**

**NEW MATERIAL:** To provide the subject modified antibody H chain wherein the amino acid sequence of the complementarity-determining region(CDR) of a variable region and a part of amino acids at the N-terminal and/or C-terminal of a framework adjacent to the amino acid sequence are sequences originated from the monoclonal antibody of a mouse and wherein other framework regions are amino acid sequences originated from a human antibody. **USE:** The neutralization of HIV, etc.

**PREPARATION:** The modified antibody H chain is expressed from the fused gene of a mouse immunoglobulin gene with a human immunoglobulin gene by a genetic recombination technique.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-141095

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

C 12 P 21/08  
C 07 K 15/04

識別記号

庁内整理番号

8214-4B  
7731-4H  
8717-4B

④ 公開 平成4年(1992)5月14日

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全15頁)

⑬ 発明の名称 組換え抗HIV改変抗体および改変抗体の調製方法

⑭ 特 願 平2-266091

⑮ 出 願 平2(1990)10月2日

⑯ 発 明 者	前 田 浩 明	熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142 公団4-609
⑯ 発 明 者	松 下 修 三	熊本県熊本市水前寺2-22-22
⑯ 発 明 者	江 田 康 幸	熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88
⑯ 発 明 者	来 海 和 彦	熊本県熊本市京町本丁4-60
⑯ 発 明 者	時 吉 幸 男	熊本県熊本市若葉3丁目14-19
⑯ 発 明 者	マリー・エム・ベンデ イツク	イギリス国 ロンドン NW6 1TX、ウエスト・ハム ステツド、ソレント・ロード 64
⑰ 出 願 人	財団法人化学及血清療 法研究所	熊本県熊本市清水町大窪668番地

最終頁に続く

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

組換え抗HIV改変抗体および改変抗体の調製方法

2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)活性を有するヒト×マウス改変抗体H鎖であって、可変領域の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列とそれに隣接するフレームワーク領域(FR)のN末端および/またはC末端の一部のアミノ酸とがマウスモノクローナル抗体由来の配列であり、これ以外のフレームワーク領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とする組換え抗HIV改変抗体H鎖。

(2) 該マウス抗体由来のアミノ酸配列の領域が、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端側5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端側6個のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の組換え抗HIV改変抗体H鎖。

(3) 可変領域のマウス抗体由来のCDRとその両端のアミノ酸配列が、下記のアミノ酸配列である前記

第(2)項記載の抗HIV改変抗体H鎖。

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXT-TYPIE-WNKQNX  
XXXXXIG-MFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVXXXXXXXXXX  
XXXXXXXXXXXXX-HYGSAYANDY-XXXXXXXXXXXX

(xxx..xはヒト抗体由来のアミノ酸配列、下線

の部分はCDRのアミノ酸配列)

(4) 該ヒト抗体由来のアミノ酸配列が、ヒト抗体サブグループIに属する抗体のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の抗HIV改変抗体H鎖。

(5) 可変領域が、下記のアミノ酸配列からなる前記第(1)項記載の抗HIV改変抗体H鎖。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF-TYPE-WNKQHPG  
QGLEWIG-MFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVDSTNTAYNELS  
SLRSEDTAVYYCAI-HYGSAYANDY-WGQGLTVTVSS

(下線部分はマウス抗体由来のアミノ酸配列)

(6) 抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)活性を有するヒト×マウス改変抗体L鎖であって、相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列がマウスモノクローナル抗体由来の下記のアミノ酸配列であり、フレームワーク領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であるこ

とを特徴とする組換え抗HIV改変抗体鎖。

CDR1: KASQSVVDYDGD SYNN

CDR2: AASHLES

CDR3: QQSNEPFFT

(7) 可変領域が、下記のアミノ酸配列からなる前記第(6)項記載の抗HIV改変抗体鎖。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC-KASQSVVDYDGD SYNN-WYQQ  
KPGKAPKLLIY-AASHLES-GVPSRFSGSGSGTDFITFTISLQ  
EDIATYYC-QQSNEPFFT-FGQGTKVEIKR

(8) 前記第(1)項記載の抗HIV改変抗体H鎖と、前記第(6)項記載の抗HIV改変抗体鎖とからなる抗HIV改変抗体。

(9) 相補性決定領域およびこれに隣接するフレーム領域の一部が特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列、残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列になるよう遺伝子組換えが行われた遺伝子であり、さらに該ヒト抗体が相補性決定領域を提供するマウス抗体可変領域とアミノ酸配列において高いホモロジーがあるサブグループのヒト抗体から選択されることを特徴とする改変抗体H鎖

変抗体鎖をコードする組換え遺伝子とを適当な発現ベクターを用いて動物細胞中で発現させこれを回収することからなる改変抗体の調製方法。

(12) 該H鎖の特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列の領域が、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端6個のアミノ酸配列である前記第(11)項記載の調製方法。

(13) 該特異的マウス抗体が、抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)活性を有する抗体である前記第(9)項または(11)項に記載の調製方法。

(14) 該改変抗体H鎖可変領域のマウス抗体由来のアミノ酸配列が、下記のアミノ酸配列である前記第(13)項記載の調製方法。

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxT-TYPIE-WNKQRxx  
xxxxxIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVxxxxxxxxxx  
xxxxxxxxxxxxxI-HYGSAYANDY-xxxxxxxxxx

(xxx..xはヒト抗体由来のアミノ酸配列、下線の部分はCDRのアミノ酸配列)

(15) 該ヒト抗体由来のアミノ酸配列が、ヒト抗体

をコードする組換え遺伝子を調製し、これを適当な発現ベクターを用いて動物細胞中で発現・回収することからなる改変抗体H鎖の調製方法。

(10) 該特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列の領域が、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端6個のアミノ酸配列である前記第(9)項記載の調製方法。

(11) 相補性決定領域およびこれに隣接するフレーム領域の一部が特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列、残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列になるよう遺伝子組換えが行われた遺伝子であり、さらに該ヒト抗体が相補性決定領域を提供するマウス抗体可変領域とアミノ酸配列において高いホモロジーがあるサブグループのヒト抗体から選択されることを特徴とする改変抗体H鎖をコードする組換え遺伝子と、少なくとも相補性決定領域が特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列であり残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列となるよう遺伝子組換えが行われた改

サブグループIに属する抗体のアミノ酸配列である前記第(13)項記載の調製方法。

(16) 該改変抗体H鎖改変領域が下記のアミノ酸配列からなる前記第(13)項記載の調製方法。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQYTFI-TYPIE-WNKQRPG  
QGLEWIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVDTSTNTAYNELS  
SLRSEDTAVYYCAI-HYGSAYANDY-WGQGTLVTVSS

(下線部分はマウス抗体由来のアミノ酸配列)

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するエイズ(AIDS)の治療および予防に期待できる新規な組換え抗HIV改変抗体に関する。さらに詳細には、マウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子との融合遺伝子から遺伝子組換え技術を用いて発現され、HIVに対し中和抗体を有する抗HIV改変抗体に関する。さらには、このような有用な改変抗体の新規調製方法に関する。

#### 発明の背景

後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome: AIDS)は、レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するウイルス性疾患である。この疾患は1981年にアメリカで発見されて以来またたく間に世界中に広がり、世界保健機構(WHO)の集計によれば、1987年8月12日時点においてすでに122ヶ国に発生が認められ、患者総数は6万人を越している。わが国においても1987年9月4日時点で50人の患者が確認され、そのうち28人はすでに死亡している。AIDSはこのように急速に世界中に広がりを見せている。

抗HIV治療剤として、現在アジドチミジン(AZT)がある[Nature: 326, p430, (1987)]が、生体の造血組織に対する強い毒性を有するため多くの例で貧血をもたらすことがわかっている。その他、多くの物質が抗HIV剤の候補として研究が行われているが、有効であり且つ安全な抗HIV剤はまだ開発されているとは言えない。また本病予防のための実用可能なワクチン開発に成功したというような報告もない。

代替品としてHIVウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術は、これまでに主としてマウス型モノクローナル抗体において確立されている。ハイブリドーマ等の細胞が産生するモノクローナル抗体は大量にしかも半永久に得られ、原料不足の問題を解消できうる。しかし、ここにおけるモノクローナル抗体は、副作用(マウスモノクローナル抗体をヒトに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用を起こすことが考えられる)をなくす意味から、従来のマウスモノクローナル抗体ではなくヒトモノクローナル抗体でなければならぬ。

このヒトモノクローナル抗体の作製法には次のようなものが考えられる。(1)ヒト×ヒトハイブリドーマを用いる方法、(2)ある種のウイルス及び化学薬剤等でトランスフォームさせたヒトリンパ球を用いる方法、(3)ヒト×マウスヘテロハイブリドーマを用いる方法、(4)ヒト×マウスヘテロハイブ

このような状況の中で、輸血によってHIV陽性となったサラセミアの患者グループと小児のAIDS及びARC(AIDS関連症候群)のグループにおいて、その臨床と中和抗体の関連についての報告がある[R. Guroffら, J. Immunol., 138, p3731, (1987); R. Guroffら, Pediatric Research, in press]。いずれの場合でも中和抗体の検出できる症例においては臨床症状も軽く良好であるが、中和抗体が検出できない症例においては臨床症状が悪化していることが報告されており、in vivoにおける中和抗体の有効性を示唆している。このように抗HIV中和抗体はin vivoにおける感染の拡大防止や感染細胞の排除に役立つ可能性があり、現在臨床で用いられている抗ウイルス剤等との併用により更に高い効果が得られることが期待される。

#### 従来技術

上記のような抗HIV中和抗体としてAIDSの患者から採取・調製するやり方もあるが、この方法は、倫理的な問題や原材料入手の問題など数多い困難が予想される。そこで、このような高力価血清の

リドーマを親株としたヒト×(ヒト×マウス)ハイブリドーマを用いる方法、(5)キメラモノクローナル抗体[抗原と結合する可変(V)領域はウイルス中和活性を有するマウスモノクローナル抗体から、抗原性あるいは免疫原性及び生理活性に関与する定常(C)領域はヒトモノクローナル抗体からなる、マウス(V)-ヒト(C)キメラモノクローナル抗体]を遺伝子組換えで作製する方法等であるが、これらの方法による成功例は一切報告されていない。

ここで、(1)については融合効率が低いことや適当なミエロマ親株がない、(2)についてはヒトの場合のEBウイルスで得られる抗体産生細胞は主としてIgM産生細胞が多く力価の低い場合が多く実用的でない、またEBウイルス以外には適当なウイルスや化学薬剤がない、さらに、(3)(4)の方法ではこれまでの作製例から考えて、目的のヒト型モノクローナル抗体を高効率に得るまでには多くの困難が予想される(例えば、安定性の問題等)、従って、(5)のキメラモノクローナル抗体法がより実現性の高い方法であると考えられる。

このキメラモノクローナル抗体は、可変(V)領域の原料となるマウスモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマからクローニングしたそのV遺伝子と、定常(C)領域の原料となるヒト抗体産生細胞等のヒト細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス(V)-ヒト(C)キメラ抗体遺伝子を含むプラスミドベクターを、動物細胞(例えば、マウスミエローマ)宿主中で発現させ、その培養上清中に得られるものである。キメラ抗体に関するいくつかの報告がすでに見受けられる(特開昭60-155132号、特開昭61-47500号)。この方法ではモノクローナル抗体作製のためのリンパ球の原質をヒトに求める必要はなく、HIVのような危険度の高い抗原に対する抗体を作製する場合、特にバイオハザードの面から望ましい。本発明者らも既に抗HIVキメラ抗体の作製に成功している[特開昭63-20255]。しかし、最近の報告[A. F. LoBuglio et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220 (1989)]によればキメラ抗体であってもまだマウスの抗原性が残っており、その副作用や血中

半減期はマウス抗体とヒト抗体のちょうど中間であるという。このようにキメラ抗体にはまだマウスV領域に起因すると思われる抗原性が残っており、この抗原性をできるだけ取り除くことが望ましい。

ところで、抗体の可変領域は抗原結合に強く関与している3つの相補性決定領域(CDR)とそれらの抗原結合部位を支える抗体の構造に関与している4つの骨格(フレーム)部(FR)に分けることができる。そこで、G. WinterはこのマウスV領域の3つのCDRをヒトV領域の4つのFRに遺伝子工学的に移植することにより、キメラ抗体よりさらに抗原性の少ない改変抗体(リシェイプド抗体: reshaped Ab)を作製した(特開昭62-296890号)。

しかし、単純にマウスCDR部分をヒトFR部分に移植しただけでは抗原結合活性を再現できない場合があり、この技術が全ての抗体に適用できるとは言えない。すなわち、改変抗体において抗原結合活性を普遍的に再現するためにはG. Winterのいう方法だけで不十分であり、より普遍的な方法が

必要とされている。

現在までにG. Winterの技術を普遍的に使用できるように改良した例はなく、ましてやHIVに対して中和活性を有する抗HIV改変抗体の作製に成功した例はない。

#### 発明の目的

このような状況において、本発明者らは先に作製した抗HIV中和マウス-ヒトキメラ抗体をG. Winterの技術を用いて改変した。さらに本発明者らは、既にG. Winterが述べた方法をさらに改良し、従来の技術からできる改変抗体より抗体としての結合活性の高い改変抗体を調製することに成功し、より一般的に、どの抗体にも適用できるとされる改変の法則を発見した。

すなわち本発明は、これまでに一切報告されていない抗HIV中和活性を持つ改変抗体およびこのような改変抗体の調製方法を提供するものであり、この新規抗HIV改変抗体からなる副作用の少ないAIDS診断薬、治療薬、予防薬の開発を可能にするものである。および、これを通じて改変抗体の一

般的な調製方法を確認することを目的とする。

#### 発明の構成および効果

改変抗体の調製方法は既にG. Winterらが発表しており、改変抗体の作製例がいくつかある。例えば、マウス抗ハプテン抗体(BI-8)のVH領域の3つのCDRをヒトミエローマ蛋白(HEW)のVH領域のFRに単純に組み込んだ結果、マウスVL領域との組合せでハプテンに対する結合活性が得られた[P. T. Jones, et al., Nature, 321, 522(1986)]。しかしハプテン抗原は分子サイズが小さく、これと結合する抗体の抗原結合領域も限られている。したがってCDRを移植した結果抗原結合サイトが再構築されたのか単に一部のCDRポケットに結合しているだけなのか区別がつけ難い。そこで彼らは次にリゾチームに対する抗体(DI.3)を改変した。BI-8抗体と同様にVH領域の3つのCDRをヒトミエローマ蛋白(HEW)のVH領域のFRに単純に組み込んだ結果、マウスVL領域との組合せでリゾチームに対する結合活性が得られた[W. Verhoeyen, et al., Science, 239, 1534 (1988)]。しかしこの場合、H鎖

だけの改変にもかかわらず結合活性は1/10に低下した。残るCAMPATH-1抗原に対するラット抗体の改変[L. Riechmann, et al., Nature, 332, 323 (1988)]では、最初にH鎖とL鎖ともラット抗体のCDRをヒト抗体(VHはNEW、VLはREI)のFRにそれぞれ単独に移植した結果、ほとんど結合活性は得られなかった(1/40に低下)。その後ラットVHのFR1領域の一部をさらにヒトVHに移植することによって、1/3程度まで回復させた。しかし、薬物投与における安全性あるいは製造コスト等を考えると、活性低下をより小さくすることが望まれる。

以上の結果は、G. Winterらの改変抗体技術が、実際に最も適用されるであろう分子量の大きな抗原に対して、単独にCDRをFRに移植するというだけでは対応できないことを示唆している。すなわち、ハプテンのようなサイズの小さい抗原の場合を除いて、通常の抗原に対しては、この改変抗体の技術はまだ完成しているとは言えない。

本発明者等は前述の抗HIV抗体の改変を行なった結果、実用に耐える中和活性を持った抗HIV改変

抗体の作製に成功し、さらにこの過程においてG. Winterらの改変抗体技術をさらに改良し一般的にどの抗体にも適用できるような方法を見出し改変抗体技術を完成させるに至った。

すなわち、相補性決定領域およびこれに隣接するフレーム領域の一部が目的の結合活性を有する特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列であり、残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列になるよう遺伝子組換えが行われた遺伝子であって、さらに該ヒト抗体が相補性決定領域を提供するマウス抗体可変領域とアミノ酸配列において高いホモロジーがあるサブグループのヒト抗体から選択されることを特徴とする改変抗体H鎖をコードする組換え遺伝子を調製し、これを適当な発現ベクターを用いて動物細胞中で発現させ回収することにより得られる改変抗体H鎖を得た。このようにして得られた改変抗体H鎖とG. Winterの方法に従って調製された改変抗体L鎖とからなる改変抗体の特異的結合活性を分析した結果、本発明の調製方法による改変抗体が、従来の改変抗体と比

較して特異性が高いことを確認した。さらにより好ましい改変抗体調製において、H鎖可変領域の中でマウス由来のアミノ酸配列にする領域としては、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端6個のアミノ酸配列であることが見いだされた。例えば、抗HIV活性を有する改変抗体を調製する場合には、マウス抗体由来のアミノ酸配列にする領域およびアミノ酸配列の好ましい一例としては、下記が挙げられる。

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXT-TYPIE-WMKQNX  
XXXXXIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVXXXXXXXXXXXX  
XXXXXXXXXXXXX-I-HYGSAYANDY-XXXXXXXXXXXX

但し、xxx...xはヒト抗体由来のアミノ酸配列。  
下線...の部分はCDRのアミノ酸配列を示す。

そして、ヒト型抗体にする場合の改変抗体の可変領域全体のアミノ酸配列としては、好ましい一例として下記のアミノ酸配列が挙げられる。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFI-TYPIE-WMKQHPG  
QGLEWIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVDTSTNTAYMELS

SLESEDTAVYYCAI-HYGSAYANDY-NGQGTLVTVSS

但し、下線...部分はマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す。

L鎖についても、H鎖と同様にフレーム領域の一部も含めてマウス抗体由来の配列にすることで従来の改変抗体L鎖と較べて活性を向上させることも可能であるが、従来の改変抗体の調製方法で得られたL鎖と上記の本発明により提供されるH鎖とからなる改変抗体でも十分な活性を得ることが可能である。

抗HIV活性を有する改変抗体L鎖を調製する上では、マウス抗体由来のCDRのアミノ酸配列の一例として下記の配列を挙げることができる。

CDR1: KASQSVVDYDGDSYNF

CDR2: AASHLES

CDR3: QQSNEDPFT

さらにヒト型改変抗体にする場合にはL鎖可変領域のアミノ酸として下記のものが挙げられる。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC-KASQSVVDYDGDSYNF-WYQQ  
KPGKAPKLLIY-AASHLES-GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQP

EDIATYYC-QQSNEDPFT-FGQGTKVEIKR

(但し、下線はCDRのアミノ酸配列)

最も好ましい改変抗体を作製する上で重要なポイントは、場合に応じて、CDRを提供するV領域からどの部分のアミノ酸をヒトV領域に移植するか決定することであり、移植すべきアミノ酸の決定方法の要点が以下、本発明により開示される。

#### ① CDRを移植するためのヒトFR領域の決定

抗体遺伝子のV領域にはさまざまな種類のサブグループがあることが知られており、例えば、Kabata [Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987]による分類によればヒトのVH領域の場合3種類、マウスVH領域で本能的に4種類(詳しくは11種類)というように分類される。抗体蛋白の基本構造はさまざまなサブグループ間で保たれているが、詳細には各サブグループ間で異なる。したがって、最終的な結合活性にはFR領域の差異が大きく関与してくると予想される。そこで、FRを提供するヒトV領域のサブグル

ープは、したがって、CDR移植の際にはこの構造も移植できるように、FR領域部分でこの構造に関与しているアミノ酸は移植する必要がある。

#### ② 特異アミノ酸の決定

抗体遺伝子特にV領域遺伝子は体細胞突然変異を受けることが知られている。これらの突然変異によって、上記の注目すべきアミノ酸以外にCDRドメイン構造に関与した特異的なアミノ酸がFR領域の中に生じる事がある。そのようなアミノ酸はアミノ酸の性質(疎水性親水性、酸性塩基性、分子サイズ等)を比較すれば見つけることができる。また、そのようなアミノ酸がCDRドメイン構造に関与しているかどうかはコンピュータを用いたモデリングにより容易に推定することができる。

以上示したようにCDRを提供するV領域からこれらの条件を満足させるようにアミノ酸を決定し、これらのアミノ酸を受け入れ側のヒトV領域に移植すれば、どのような抗体でも改変することが可能である。

変型の改変はV領域をコードする遺伝子上で、長

ープはCDRを提供するV領域のサブグループとホモロジーの高いものの中から選ぶべきである。このホモロジー検索はコンピュータを使って行われる。

#### ③ VHVL両ドメインのパッキングに関与するアミノ酸の決定

VHVL両ドメインは独立して抗原と結合するのではなく、お互いに密接に相互作用し合いながらCDRにより抗原結合ポケットを構築している。このパッキングにはV領域のいくつかのアミノ酸が重要である事が知られている[C. Chothia et al., J. Mol. Biol., 186, 651 (1985)]。CDRおよびFRの一部を移植する際にはこれらのパッキングに関与したアミノ酸に注意する必要がある。

#### ④ CDR領域構築に関与するアミノ酸の決定

V領域の個々のCDRはそれぞれCDRドメインを構築するのにある決まった構造を取ることが知られている[C. Chothia et al., Nature, 342, 877 (1989)]。この構造はCanonical構造といわれており、この構造に関与したアミノ酸がいくつか知られて

いる。したがって、CDR移植の際にはこの構造も移植できるように、FR領域部分でこの構造に関与しているアミノ酸は移植する必要がある。

最後に、本発明の改変抗体調製法で得られた改変されたV領域遺伝子はヒト抗体定常(C)領域遺伝子と結合され完全な改変抗体が構築される。改変されたV領域遺伝子はその物理的な性質は何らマウス等のV領域遺伝子と変わることはなく、既知のキメラ抗体作製法を利用してキメラ抗体を作製する場合と全く同様に、改変されたV領域遺伝子とC領域遺伝子を結合させることができる。例えば、渡辺らによって既に示された方法[渡辺ら, Cancer Research, 47, p999-1005, (1987)]やM. Brugge mann (Waldmann R (ed) Monoclonal Antibody Therapy, Prog Allergy, Basel, Karger, 1988, vol 45, pp91)やS. L. Morrison[Advances in Immunology, 44, 65, (1989)]等の総説に紹介されている方法に準じて行うことができる。また、発現

させる宿主によって動物細胞発現系、大腸菌発現系、酵母細胞発現系などベクター系が異なるが、いずれの場合でも発現可能である。

次に抗HIV改変抗体について説明する。本発明の抗HIV改変抗体は上記に示した改変抗体調製法を用いて構築されたものである。この抗HIV改変抗体の構築には主に4つの過程が必要である。初めに抗HIV抗体を産生する細胞の調製、その細胞からのV領域遺伝子の単離、単離されたV領域のアミノ酸配列をもとにした改変抗体の作製、最後に得られた改変抗体遺伝子の宿主細胞における発現の4つの過程である。以下順を追って説明する。

本発明に用いる抗HIV抗体遺伝子は抗HIV抗体を産生している細胞から調製できる。抗HIV抗体産生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて調製される。例えば、H9/HTLV-ⅢBで示されるウイルス感染細胞株(ATCC No. CRL8543)や、Molt3/HTLV-ⅢB(ATCC No. CRL8602)等の入手可能なウイルス感染細胞より、ウイルス或はウイルス糖蛋白分画(env: gp41,

gp120)を精製し、これを免疫原として用い通常のハイブリドーマを作製する方法でハイブリドーマを作製すれば、抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞を得ることが可能である。更に、このようにして得られた抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の中から、HIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生している細胞を選択する。HIVの場合、該ウイルス特有の性質から、このような中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることは容易なことではないが、そのような細胞株として本発明者らは、HIVに対して中和活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ54'CB1細胞の確立に成功している[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]。

このような抗HIV中和モノクローナル抗体産生細胞より、抗原結合性を持った抗体遺伝子を通常の遺伝子操作技術により単離することができる。例えば、その細胞の染色体DNAから常法[例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab. (1982)参照]に従ってV領域遺伝子を

クローニングする方法であり、あるいは、その細胞のメッセンジャーRNAを材料として常法[例えば、D. M. Glover編集 "DNA cloning Vol. I" IRL Press (1985)]によりcDNAを合成しV領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V領域遺伝子クローニングのためのプローブとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列[例えば、坂野ら、Nature, 286, p 676, (1980); E. E. Max ら、J. Biol. Chem., 256, p5116, (1981)]を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが出来る。また、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を利用したクローニングも可能である[R. Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833 (1989); W. D. Huse, et al., Science, 246, 1275 (1989)]。本発明者は既にこのような方法により前述の54'CB1細胞から抗HIV中和活性を持ったV領域遺伝子(0.5 $\beta$  V遺伝子)を単離し、マウス-ヒトキメラ抗体の作製に成功している[特願昭63-20255]。これらが本発明の以下の改変抗体遺伝子調製に用いる最も好ましい材

料として挙げられる。

このようにして得られた0.5 $\beta$  V遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列を決定し、前述の改変抗体作製法の4つの条件を満足するようにヒト抗体V遺伝子への移植領域を決定した。その結果、VL領域の場合RL0.5 $\beta$ が、VH領域の場合RH0.5 $\beta$ がそれぞれ最も望ましい改変抗体として作られた(第1図参照)。このVHVL遺伝子の組合せによりCOS細胞で作られた抗体は0.5 $\beta$  エピトープであるBB10ペプチドに結合し、HTLVⅢBウイルスを中和した。

このようにして得られた本発明の抗HIV改変抗体はAIDSの臨床においてこれまでになかった実質的に有効なAIDS治療および予防剤となりうるものである。さらに、本発明の改変抗体調製法は、あらゆる抗体に対して改変抗体への適用を実質的に可能にするものである。

次に、その実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例

##### (1) 抗HIVマウスモノクローナル抗体の作製とその



V領域遺伝子

抗HIVマウスモノクローナル抗体を産生する細胞は、HIVウイルス(HTLV-III B)粒子及び精製したウイルス糖蛋白分画を免疫原として用いて、BALB/cマウスを免疫後、その脾細胞とX63マウスミエローマ細胞を常法により細胞融合して調製した。このハイブリドーマ、54<sup>+</sup>CB1細胞の産生する抗HIVモノクローナル抗体(0.5 $\beta$ 抗体)はHIVの外被蛋白gp120を認識し、100ng/ $\mu$ という低濃度でHIV感染を阻止する中和活性を持っている[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]。

この0.5 $\beta$ 抗体のV領域遺伝子の調製は、54<sup>+</sup>CB1細胞から染色体DNAを抽出し、そのEcoRI(宝酒造製；以下本実施例で使用した試薬は、特に断わりのない限り宝酒造製あるいは東洋紡製を使用した)で切断して構築した染色体DNAライブラリーからマウスJ領域を含んだ[32P]標識合成DNAアプローブ[坂野ら、Nature, 286, p676(1980); E. E. Maxam, J. Biol. Chem., 256, p5116(1981)]を用いてクローニングした(特願昭63-20255)。

の長鎖ヌクレオチド特定部位突然変異誘発法キットはEcksteinらの方法[Taylor, J. W. et al., Nucl. Acids Res., 13, 8749(1985)]をもとにしている。0.5 $\beta$  VL領域のRLに対する移植部位をコードする長鎖ヌクレオチドをRE1のV領域遺伝子を組み込んである鋳型M13DNAにアニーリングさせた後にdCTP $\alpha$ Sを含む溶液中でDNAの伸長・結合を行い、適当な制限酵素(ここではNciI)で鋳型M13DNAを切断、Exonuclease IIIによる鋳型DNAの消化を行なって突然変異したM13DNAのみのストランドを得た(ここまではアマシャムのキットのプロトコールに従って行なった)。さらに本発明者等はさらにこの方法にPCR法を組み合わせて高効率で突然変異させたDNAを得る方法へと改良した。すなわち、Exonuclease III消化産物を鋳型にユニバーサルプライマー(OP:M13mp18の5'側に相補的な配列を持つ)とリバースプライマー(RSP:M13mp18の3'側と同じ配列を持つ)を用いてPCRを行なった。これらのプライマーはともに20pool 使い、PCRの試薬はCETUS社のものを使用した。PCRの条件は、94℃

この0.5 $\beta$ 抗体のV領域遺伝子は、以下に示す本発明の抗HIV改変抗体調製の材料として使われた。

(2) 0.5 $\beta$ 改変抗体VL遺伝子の作製① RE1への0.5 $\beta$ 抗体VL CDRの移植

G. Winterの改変抗体作製方法にしたがって0.5 $\beta$ 抗体VH領域改変のための移植アミノ酸の選定を行なった。すなわち、G. Winterらが用いているヒトVL FRのアミノ酸配列[RE1 第2図参照: W. Palm and N. Hilschmann Z. Physiol. Chem., 356, 167(1975)]に移植する0.5 $\beta$ 抗体VL領域のアミノ酸配列の決定を行なった。すなわち、G. Winterの方法通りCDR領域のみをRE1へ移植するようデザインした(RL)。第2図にそのデザインされたRLのアミノ酸配列を示す。

② 改変抗体RLプラスミドの作製

改変抗体RLはアマシャムのキット(Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system version 2 code RPN.1523)とPCR[Saiki, R. G. et al., Science, 239, 487(1988)]を組み合わせたアマシャム-PCR法により行なった。アマシャム

1分、55℃1分、72℃1分で25サイクル行なった。

PCR終了後、産物をBamHI/HindIIIで消化し、アガロース電気泳動により目的のサイズを切りだし、pUC18のBamHI-HindIIIサイトに組み込み、DH5 $\alpha$ (BRL社)に形質転換し、1次スクリーニングとして、突然変異に使用したCDRプライマーを用いてアマシャムキットのプロトコールにしたがってコロニーハイブリダイゼーションを行ない、CDR突然変異に成功しているクローンを選んだ。その結果RL2, 45, 73の3クローンが3つのCDRとも突然変異していた。さらに、2次スクリーニングとして、得られたクローンよりプラスミドを常法により調製しシークナーゼキット(USB社)を用いてシークエンスを行なった。その結果RL値についてはクローン2, 45が正確にCDR移植が出来ていることが判明した。

(3) 0.5 $\beta$ 改変抗体VH遺伝子の作製(ヒトVH領域サブグループ2を用いた場合)① RE1への0.5 $\beta$ 抗体VH CDRの移植(Ver. a, b)

G. Winterの改変抗体作製方法にしたがって0.5 $\beta$ 抗体VH領域改変のための移植アミノ酸の選定を行

なった。すなわち、G. Winterらが用いているヒトFRのアミノ酸配列[ヒトV領域サブグループ2であるNEV図1参照: J. Poljak, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3440 (1974)]に移植する0.5 $\beta$ 抗体VH領域のアミノ酸配列の決定を行なった。移植する領域として、G. Winterの方法通りCDR領域のみ移植した場合(Ver.a: RHa)と、さらにCanonical構造[C. Chothia et al., Nature, 342, 877 (1989)]を満足するようにFR1とFR3領域の一部も合わせて移植した場合(Ver.b: RHb)の2つのバージョンをデザインした。第1図にそのデザインされたRHa, RHbのアミノ酸配列を示す。実際の改変抗体RHa, RHbは以下の④に示す方法により作製した。

#### ④改変抗体RHa, RHbプラスミドの作製

改変抗体RHa, RHbの作製には初めアマシム-PCR法を試みた。NEVのV領域遺伝子を組み込んだM13 DNAを鋳型にして、第1図に示す0.5 $\beta$  VH領域のRHa, RHbに対する移植部位をコードする長鎖ヌクレオチドをそれぞれ用いて前述のRLの場合と同様にア

ファージブラックの中から任意に選んだブラックを別のプレートに移し直してM13感染細胞のコロニーを作らせ、CDR2オリゴマーをプローブにコロニーハイブリダイゼーション(前述)を行なった。そのCDR2陽性クローンについてM13RF DNAを調製してシークエンス(前述)を行なった結果、RHa726 clone10, 139の2つが目的のCDR1, 2, 3を持っていることが分かった。

RHbの場合、CDR1のみを持つRHb1, CDR3のみを持つRHb96がアマシム-PCR法で得られたので、CDR2オリゴマーを組み合わせてRammannらが考案した2 step PCR法[Nuc. Acid Res. 17, 5404 (1989)]を用いた特定部位突然変異誘発法を用いることにした。2 step PCR法はPCRを2回繰り返すことにより目的のDNA断片の任意の部分に突然変異を入れる方法である。

第1 PCRはRHb96を鋳型にRSPとCDR2オリゴマーをプライマーにして行なった。PCRの条件は94℃ 1分, 37℃ 1分, 68℃ 3分, で30サイクル行なった。プライマーはともに20 pmol使い、PCRの試薬

マシム-PCR法を行なった。その結果いずれの場合も3のCDRがともに移植されたものは得られなかった。RHaの場合、RHa72がCDR1と3を持っていたことが分かったので、これを鋳型にKunkel法[Kunkel, T. A., Methods in Enzymology, 154, 367 (1987); Venkitaraman, A. R., Nuc. Acids Res. 17, 3314 (1989)]を用いた特定部位突然変異誘発法により残りのCDR2部分を移植した。Kunkel法は, dut-, ung-の大腸菌で作られたM13 ファージDNA(デオキシウラシル(dU)を含んでいるためung+の大腸菌のなかでは増殖できない)を鋳型にin vitro mutagenesisを行ない、dUを含まない目的の突然変異M13 DNAを合成し、さらにこれらをung+の大腸菌にトランスフェクションすることによりdUを含まないM13のみを選択的に得るという方法である。

RHa72のV領域遺伝子を持ったM13 DNAをBW313株(dut-, ung-)に感染させてdU-RHa726 ssDNAを調製した。このssDNAにCDR2をコードしているオリゴマーをアニーリング後、伸長と連結を行ない、TG1株(ung+)にトランスフェクションした。得られた

はCETUS社のものを使用した。第1 PCR終了後、アガロース電気泳動により目的のサイズを切りだし、この第1 PCR産物とUPをプライマーにRHb1を鋳型にして第1 PCRと同じ条件で第2 PCRを行なった。PCR終了後、産物をBamHI/HindIIIで消化し、アガロース電気泳動により目的のサイズを切りだし、pUC18のBamHI-HindIIIサイトに組み込み、DH5 $\alpha$  (BRL社)に形質転換した。その後、コロニーハイブリダイゼーションとシークエンス(前述)を行ない、CDR1, 2, 3をもつRHb-PCR82を得た。

#### ④キメラ抗体プラスミドの作製

改変抗体のためのコントロールとして、V領域が全てマウスであるキメラ抗体が作られた。0.5 $\beta$ のVH, VL領域の両端にPCR法を用いてHindIIIとBamHI (VH)あるいはBglII (VL)サイトをそれぞれ付加した後述の発現ベクターに組み込んだ(以下このキメラ抗体をそれぞれCH, CLとする)。PCRの条件は、94℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分で25サイクル行ない、これらのプライマーはともに20 pmol使い、PCRの試薬はCETUS社のものを使用した。0.5 $\beta$ のV

領域の核酸塩基配列とそれに対するPCRプライマーは第3図および第4図に示す。

#### (5) 改変抗体RH $\alpha$ , RH $\beta$ , RIおよびキメラ抗体CH, CLプラスミドの発現と活性

改変抗体およびキメラ抗体の発現のためにヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のエンハンサー、プロモーター[M. Whittle, et al., Protein Engineering, 1, 499 (1987)]を持った発現ベクター-HCMV- $\alpha$ , HCMV- $\gamma$ 1がそれぞれ使われた。HCMV- $\alpha$ はヒト $\alpha$ 鎖定常領域遺伝子を持ち、HCMV- $\gamma$ 1はヒト $\gamma$ 1鎖定常領域遺伝子を持つ。キメラ抗体遺伝子発現用のベクターの構造を第5図および第6図に示す。前述の(4)で作られた0.5 $\beta$ のV領域CH, CLをそれぞれHCMV- $\gamma$ 1, HCMV- $\alpha$ のHindIII-BamHIサイトに組み込んだものである。また、RH $\alpha$ , RH $\beta$ およびRI V領域遺伝子も、CH, CLの場合と同様に、HCMV- $\gamma$ 1, HCMV- $\alpha$ にそれぞれ組み込んだ。

上記のように構築したプラスミドの持つ抗体活性をCOS7細胞(ATCC CRL 1651)を用いた一時的発現系で検討した。方法はCOS7細胞にプラスミドDN

AをBio-Rad社製のエレクトロポレーション装置を用いて、Bio-Rad社のプロトコールにしたがって導入し、3日間10%牛胎児血清を含むDMEM培地(GIBCO社)で培養し、その培養上清を回収。抗ヒトIgGあるいはBH10ペプチド(0.5 $\beta$ 抗体のエピトープ)を用いたELISA法(特願昭63-20255号)によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。

結果を第7図に示す。抗体遺伝子発現に関しては全ての組合せで蛋白として発現した(第7図b)。しかし、結合活性については、コントロールであるCH $\times$ CLの組合せではBH10ペプチドに結合する抗体が得られたが、改変抗体であるRH $\alpha$  $\times$ RI, RH $\beta$  $\times$ RIの組合せでは結合活性は得られなかった(第7図a)。このことは、G. Winterの方法にしたがって単純にCDRを移植するだけでは活性が得られない場合があることを示している。また、マウス0.5 $\beta$ のVHと改変抗体のVLの組合せであるCH $\times$ RIでもキメラ抗体CH $\times$ CLの組合せと同等の結合活性を示した。このことは0.5 $\beta$ のVL領域に関して改変がうまく行っていることを示している。

#### (6) 0.5 $\beta$ 改変抗体VL遺伝子の作製(ヒトVH領域サブグループ1遺伝子を用いた場合)

##### ①SGIへの0.5 $\beta$ 抗体CDRの移植(Ver. c)

G. Winterの方法通りCDR領域のみ移植した場合(Ver. a: RH $\alpha$ )および、これに加えてCanonical構造を満足するようにFR1とFR3領域の一部も合わせて移植した場合(Ver. b: RH $\beta$ )でも結合活性が得られないことから、ヒトFR領域とマウスFR領域の関係を再検討した。過去にHEWを用いて改変化が成功した抗体のホモロジーを調べてみると、BI-8(58.6%), DI-3(65.5%), CAMPATH(52.9%)となっており、0.5 $\beta$ の場合は49.4%と低かった。0.5 $\beta$ 抗体と最もホモロジーの高いヒトのサブグループを検索したところ、サブグループ1であることが分かった。そこで、ヒトサブグループ1のVH遺伝子(SGI, 第1図参照)を以下の実験に使用した。ちなみにこのSGIと0.5 $\beta$ のホモロジーは64.4%であった。

このSGIと0.5 $\beta$ 遺伝子のアミノ酸配列を比較し、CDR部分以外に、Canonical構造、VHVLパッキング

[C. Chothia et al., J. Mol. Biol., 186, 651 (1985)], を満足するように移植領域を測定した。その配列を第1図のRHc0.5 $\beta$ に示す。

##### ②改変抗体RHcプラスミドの作製・発現・活性

RHcの作製は、SGIのV領域遺伝子を組み込んだM13DNAを鋳型にして、第1図に示す0.5 $\beta$ VH領域のRHcに対する移植部位をコードする長鎖ヌクレオチドをそれぞれ用いて前述のRIの場合と同様にアマチュム-PCR法を行なって作製した。その結果、CDRI, 2, 3が完全に移植されたRHc73を得た。このRHc73のHindIII-BamHI断片を前述のHCMV- $\gamma$ 1ベクターの同サイトに組み込みRHc0.5 $\beta$ プラスミドを作製した。

このプラスミドと改変VLの組合せ(RHc $\times$ RI)によって得られる抗体活性を前述のCOS7細胞における一時的発現系で検討した。(5)の場合と同様にして遺伝子導入細胞の培養上清を回収、抗ヒトIgGあるいはBH10ペプチド(0.5 $\beta$ 抗体のエピトープ)を用いたELISA法によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。その結果、第8図に示す

ようにBH10ペプチドに対する結合活性が得られた。しかしコントロールであるCHxCLの組合せに比べるとかなり活性が低いように思われた。

#### (7) FR領域の重要性

##### ① RHeとRHeの改良 (Ver. d.e. f.)

SGIのVH領域を用いた結果、改変抗体に結合活性が得られたが、さらに高い活性を与えるためにFR領域内の特異アミノ酸について検討した。移植先のヒト遺伝子をHEWからSGIに変えることによって、0.5βに対するFR領域のホモロジーは49.4%から64.4%に上昇したが、その大部分はFR1領域に寄与するところが大きく、FR2、FR3にはほとんど変化がなかった。したがって、この部分のアミノ酸を再検討しより結合活性の強い改変抗体を作製しようと試みた。FR2の3'とFR3の3'の特異アミノ酸をさらにRHeに移植した。FR2の3'とFR3の3'の特異アミノ酸を持つもの(RHe)と、FR2の3'の特異アミノ酸のみを持つもの(RHf)をデザインした。合わせて、同部分のHEWをベースとしたRHeへの移植も試みた(RHd)。これらのアミノ酸配列を第1図

に示す。

#### ② 改変抗体RHe, RHe, RHfプラスミドの作製・発現・活性

これらの改変VH領域遺伝子は前述のアマシエム-PCR法、Kunkel法、2step-PCR法を適時組み合わせで構築した。構築した改変VH領域遺伝子は前述のHCMV-γ1ベクターに組み込まれ、RHe0.5β, RHf0.5β, RHd0.5βがそれぞれ作られた。これらのプラスミドを前述のCOS7細胞における一時的発現系でその活性を検討した。

その結果、RHexRL, RHfxRLの組合せの順で強い結合活性が得られた(第8図)。この結果より、FR2およびFR3領域の特異アミノ酸が結合活性には必要であることが示された。また、RHdxRLの組合せでも結合活性は検出されなかった(第7図)ことから、0.5β抗体の場合、ホモロジーの高いヒトサブグループを選ぶことがまず重要であると思われる。

#### (8) 改変抗体の活性

##### ① 競争阻害活性

いえる。

##### ② 中和活性

CEN/LAVの培養上清をウイルス原液( $10^{5.5}$ から $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>)として使用した。

まず、10TCID<sub>50</sub>/50μlに調整したウイルス液をアフィニティ精製した抗体、0.5βキメラ抗体、0.5β抗体各50μl(種々の段階希釈したもの)とを96穴の平底プレートにはん種し、37℃で1時間インキュベートした。その後、MT4細胞を $10^4$ 個/100μl/穴(10%FCS, L-グルタミン3.5~4.0g/l, ペニシリン50u/ml及びストレプトマイシン50μg/mlを含むRPMI1640培地に浮遊したもの)で添加し、5日間培養した。5日後、感染時にしょうじる合胞体形成(シンシチウムフォーメーション)を抗体が阻害するか否かで中和活性を判定した。また、中和活性は合胞体形成を100%阻害する抗体の最低有効濃度として表示した。その結果を下記表1に示す。

0.5β抗体を改変化することに成功したが、このRHexRLの作る改変抗体がオリジナルのマウス0.5β抗体に比べてどの程度の活性を持つのか、その能力を競争阻害実験により検討した。BH10ペプチドを固定したプレートに、インディケーターとしてのペルオキシダーゼ標識マウス0.5β抗体(マレイミド法にしたがって作製)と競合抗体としての各種抗体(CHxCL, RHexRL, RHfxRL, RHexRL, ヒトポリクローナル抗体)を混合して加え、37℃2時間反応させた後にTMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン: 同化学)で発色させた。その結果を第9図に示す。最終濃度0.04μg/mlのペルオキシダーゼ標識マウス0.5β抗体に対して競合抗体の抗体濃度を順次変えていったところ、CHxCLのキメラ抗体はマウス0.5β抗体とほぼ同じ軌跡を示した。また、RHexRLおよびRHfxRLの作る抗体も競合した。抗体濃度から計算してRHexRLおよびRHfxRLはオリジナルの0.5β抗体に比べてそれぞれ約1/2、1/4の活性を持っていることが示された。RHexRLの約1/2は過去の改変抗体の成績に比べると最もいい値と

表 1

モノクローナル抗体	ウイルス中和活性 <sup>1)</sup>
RHe × RL	50.0
RHe × RL	6.2
RHi × RL	50.0
CH × CL	3.1
0.5β	3.1

1) ウイルス感染100%阻害する抗体の最低有効濃度 (μg/ml) として表わした。感染価は10TCID<sub>50</sub>/50μlとした。

オリジナルである0.5β抗体及び0.5βキメラ抗体 (CH×CL) は、3.1μg/ml の濃度でウイルス感染を100%阻害するが、改変抗体については、RHe×RLにおいて6.3μg/ml の濃度でウイルス感染を100%阻害していることが判る。この改変抗体RHeRLの融合阻害活性は前述したように、0.5β抗体及び0.5βキメラ抗体の約1/2の活性を示すが、中和活性においてもオリジナル抗体の1/2活性を示すことがわかる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、マウス0.5β抗体、ヒト抗体HEM、SG

および、各種改変0.5β抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

第2図は、マウス0.5β抗体、ヒト抗体REIおよび改変0.5β抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

第3図は、マウス0.5β抗体のVH領域遺伝子のDNA塩基配列およびキメラ抗体遺伝子作製のためのPCRプライマーの配列とその位置を示したものである。

第4図は、マウス0.5β抗体のVL領域遺伝子のDNA塩基配列およびキメラ抗体遺伝子作製のためのPCRプライマーの配列とその位置を示したものである。

第5図および第6図は、それぞれ0.5βキメラ抗体H鎖遺伝子およびL鎖遺伝子を含む発現型プラスミドの一例を示したものである。

第7図および第8図は、それぞれ0.5βキメラ抗体および各種改変抗体のELISAアッセイの結果の一例を示したものである。

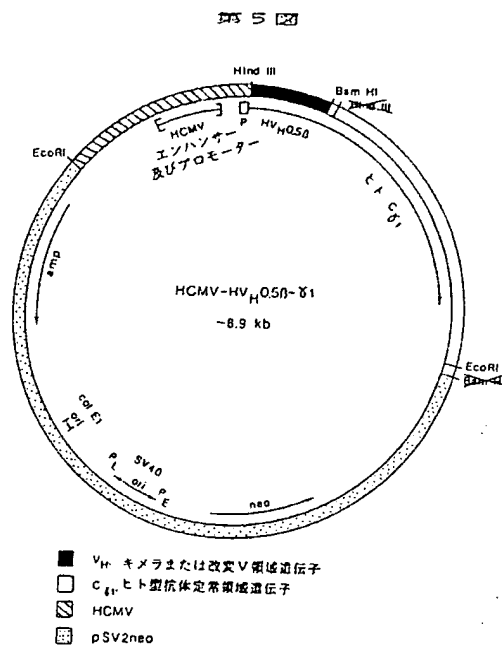
第9図は、0.5βキメラ抗体および各種改変抗体

の融合阻害実験結果の一例を示したものである。

特許出願人 財団法人 化学及血清療法研究所

表 1 (続)

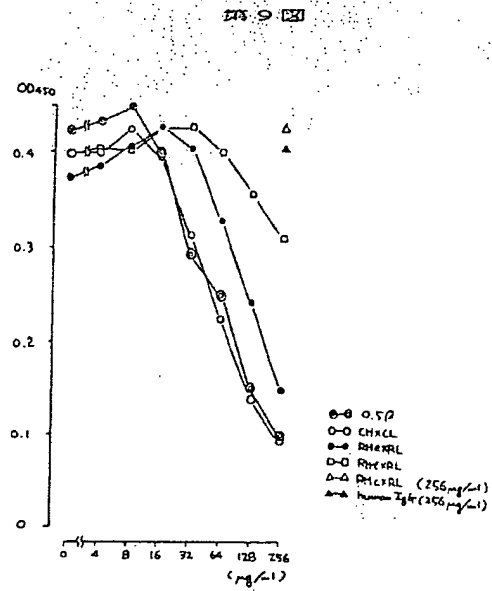
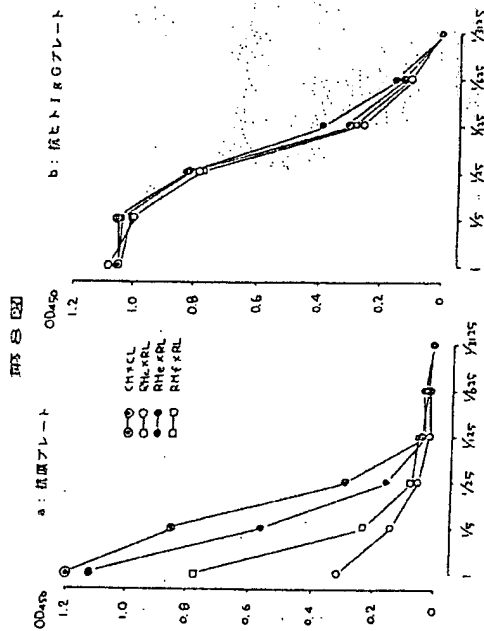
アミノ酸位置	CDR1	CDR2	CDR3	FR1	FR2	FR3
0.5β	12345678910111213141516171819202122232425262728293031323334353637383940414243444546474849505152535455565758596061626364656667686970717273747576777879808182838485868788899091929394959697989910010110210310410510610710810911011111211311411511611711811912012112212312412512612712812913013113213313413513613713813914014114214314414514614714814915015115215315415515615715815916016116216316416516616716816917017117217317417517617717817918018118218318418518618718818919019119219319419519619719819920020120220320420520620720820921021121221321421521621721821922022122222322422522622722822923023123223323423523623723823924024124224324424524624724824925025125225325425525625725825926026126226326426526626726826927027127227327427527627727827928028128228328428528628728828929029129229329429529629729829930030130230330430530630730830931031131231331431531631731831932032132232332432532632732832933033133233333433533633733833934034134234334434534634734834935035135235335435535635735835936036136236336436536636736836937037137237337437537637737837938038138238338438538638738838939039139239339439539639739839940040140240340440540640740840941041141241341441541641741841942042142242342442542642742842943043143243343443543643743843944044144244344444544644744844945045145245345445545645745845946046146246346446546646746846947047147247347447547647747847948048148248348448548648748848949049149249349449549649749849950050150250350450550650750850951051151251351451551651751851952052152252352452552652752852953053153253353453553653753853954054154254354454554654754854955055155255355455555655755855956056156256356456556656756856957057157257357457557657757857958058158258358458558658758858959059159259359459559659759859960060160260360460560660760860961061161261361461561661761861962062162262362462562662762862963063163263363463563663763863964064164264364464564664764864965065165265365465565665765865966066166266366466566666766866967067167267367467567667767867968068168268368468568668768868969069169269369469569669769869970070170270370470570670770870971071171271371471571671771871972072172272372472572672772872973073173273373473573673773873974074174274374474574674774874975075175275375475575675775875976076176276376476576676776876977077177277377477577677777877978078178278378478578678778878979079179279379479579679779879980080180280380480580680780880981081181281381481581681781881982082182282382482582682782882983083183283383483583683783883984084184284384484584684784884985085185285385485585685785885986086186286386486586686786886987087187287387487587687787887988088188288388488588688788888989089189289389489589689789889990090190290390490590690790890991091191291391491591691791891992092192292392492592692792892993093193293393493593693793893994094194294394494594694794894995095195295395495595695795895996096196296396496596696796896997097197297397497597697797897998098198298398498598698798898999099199299399499599699799899910001001100210031004100510061007100810091010101110121013101410151016101710181019102010211022102310241025102610271028102910301031103210331034103510361037103810391040104110421043104410451046104710481049105010511052105310541055105610571058105910601061106210631064106510661067106810691070107110721073107410751076107710781079108010811082108310841085108610871088108910901091109210931094109510961097109810991100110111021103110411051106110711081109111011111121113111411151116111711181119112011211122112311241125112611271128112911301131113211331134113511361137113811391140114111421143114411451146114711481149115011511152115311541155115611571158115911601161116211631164116511661167116811691170117111721173117411751176117711781179118011811182118311841185118611871188118911901191119211931194119511961197119811992002012022032042052062072082092102112122132142152162172182192202212222232242252262272282292302312322332342352362372382392402412422432442452462472482492502512522532542552562572582592602612622632642652662672682692702712722732742752762772782792802812822832842852862872882892902912922932942952962972982993003013023033043053063073083093103113123133143153163173183193203213223233243253263273283293303313323333343353363373383393403413423433443453463473483493503513523533543553563573583593603613623633643653663673683693703713723733743753763773783793803813823833843853863873883893903913923933943953963973983994004014024034044054064074084094104114124134144154164174184194204214224234244254264274284294304314324334344354364374384394404414424434444454464474484494504514524534544554564574584594604614624634644654664674684694704714724734744754764774784794804814824834844854864874884894904914924934944954964974984995005015025035045055065075085095105115125135145155165175185195205215225235245255265275285295305315325335345355365375385395405415425435445455465475485495505515525535545555565575585595605615625635645655665675685695705715725735745755765775785795805815825835845855865875885895905915925935945955965975985996006016026036046056066076086096106116126136146156166176186196206216226236246256266276286296306316326336346356366376386396406416426436446456466476486496506516526536546556566576586596606616626636646656666676686696706716726736746756766776786796806816826836846856866876886896906916926936946956966976986997007017027037047057067077087097107117127137147157167177187197207217227237247257267277287297307317327337347357367377387397407417427437447457467477487497507517527537547557567577587597607617627637647657667677687697707717727737747757767777787797807817827837847857867877887897907917927937947957967977987998008018028038048058068078088098108118128138148158168178188198208218228238248258268278288298308318328338348358368378388398408418428438448458468478488498508518528538548558568578588598608618628638648658668678688698708718728738748758768778788798808818828838848858868878888898908918928938948958968978988999009019029039049059069079089099109119129139149159169179189199209219229239249259269279289299309319329339349359369379389399409419429439449459469479489499509519529539549559569579589599609619629639649659669679689699709719729739749759769779789799809819829839849859869879889899909919929939949959969979989991000100110021003100410051006100710081009101010111012101310141015101610171018101910201021102210231024102510261027102810291030103110321033103410351036103710381039104010411042104310441045104610471048104910501051105210531054105510561057105810591060106110621063106410651066106710681069107010711072107310741075107610771078107910801081108210831084108510861087108810891090109110921093109410951096109710981099110011011102110311041105110611071108110911101111112111311141115111611171118111911201121112211231124112511261127112811291130113111321133113411351136113711381139114011411142114311441145114611471148114911501151115211531154115511561157115811591160116111621163116411651166116711681169117011711172117311741175117611771178117911801181118211831184118511861187118811891190119111921193119411951196119711981199200201202203204205206207208209210211212213214215216217218219220221222223224225226227228229230231232233234235236237238239240241242243244245246247248249250251252253254255256257258259260261262263264265266267268269270271272273274275276277278279280281282283284285286287288289290291292293294295296297298299300301302303304305306307308309310311312313314315316317318319320321322323324325326327328329330331332333334335336337338339340341342343344345346347348349350351352353354355356357358359360361362363364365366367368369370371372373374375376377378379380381382383384385386387388389390391392393394395396397398399400401402403404405406407408409410411412413414415416417418419420421422423424425426427428429430431432433434435436437438439440441442443444445446447448449450451452453454455456457458459460461462463464465466467468469470471472473474475476477478479480481482483484485486487488489490491492493494495496497498499500501502503504505506507508509510511512513514515516517518519520521522523524525526527528529530531532533534535536537538539540541542543544545546547548549550551552553554555556557558559560561562563564565566567568569570571572573574575576577578579580581582583584585586587588589590591592593594595596597598599600601602603604605606607608609610611612613614615616617618619620621622623624625626627628629630631632633634635636637638639640641642643644645646647648649650651652653654655656657658659660661662663664665666667668669670671672673674675676677678679680681682683684685686687688689690691692693694695696697698699700701702703704705706707708709710711712713714715716717718719720721722723724725726727728729730731732733734735736737738739740741742743744745746747748749750751752753754755756757758759760761762763764765766767768769770771772773774775776777778779780781782783784785786787788789790791792793794795796797798799800801802803804805806807808809810811812813814815816817818819820821822823824825826827828829830831832833834835836837838839840841842843844845846847848849850851852853854855856857858859860861862863864865866867868869870871872873874875876877878879880881882883884885886887888889890891892893894895896897898899900901902903904905906907908909910911912913914915916917918919920921922923924925926927928929930931932933934935936937938939940941942943944945946947948949950951952953954955956957958959960961962963964965966967968969970971972973974975976977978979980981982983984985986987988989990991992993994995996997998999100010011002100310041005100610071008100910101011101210131014101510161017101810191020102110221023102410251026102710281029103010311032103310341035103610371038103910401041104210431044104510461047104810491050105110521053105410551056105710581059106010611062106310641065106610671068106910701071107210731074107510761077107810791080108110821083108410851086108710881089109010911092109310941095109610971098109911001101110211031104110511061107110811091110111111211131114111511161117111811191120112111221123112411251126112711281129113011311132113311341135113611371138113911401141114211431144114511461147114811491150115111521153115411551156115711581159116011611162116311641165116611671168116911701171117211731174117511761177117811791180118111821183118411851186118711881189119011911192119311941195119611971198119920020120220320420520620720820921021121221321421521621721821922022122222322422522622722822923023123223323423523623723823924024124224324424524624724824925025125225325425525625725825926026126226326426526626726826927027127227327427527627727827928028128228328428528628728828929029129229329429529629729829930030130230330430530630730830931031131231331431531631731831932032132232332432532632732832933033133233333433533633733833934034134234334434534634734834935035135235335435535635735835936036136236336436536636736836937037137237337437537637737837938038138238338438538638738838939039139239339439539639739839940040140240340440540640740840941041141241341441541641741841942042142242342442542642742842943043143243343443543643743843944044144244344444544644744844945045145245345445545645745845946046146246346446546646746846947047147247347447547647747847948048148248348448548648748848949049149249349449549649749849950050150250350450550650750850951051151251351451551651751851952052152252352452552652752852953053153253353453553653753853954054154254354454554654754854955055155255355455555655755855956056156256356456556656756856957057157257357457557657757857958058158258358458558658758858959059159259359459559659759859960060160260360460560660760860961061161261361461561661761861962062162262362462562662762862963063163263363463563663763863964064164264364464564664764864965065165265365465565665765865966066166266366466566666766866967067167267367467567667767867968068168268368468568668768868969069169269369469569669769869970070170270370470570670770870971071171271371471571671771871972072172272372472572672772872973073173273373473573673773873974074174274374474574674774874975075175275375475575675775875976076176276376476576676776876977077177277377477577677777877978078178278378478578678778878979079179279379479579679779879980080180280380480580680780880981081181281381481581681781881982082182282382482582682782882983083183283383483583683783883984084184284384484584684784884985085185285385485585685785885986086186286386486586686786886987087187287387487587687787887988088188288388488588688788888989089189289389489589689789889990090190290390490590690790890991091191291391491591691791891992092192292392492592692792892993093193293393493593693793893994094					

[illegible]

3 3 3

[illegible]





第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>		識別記号	片内整理番号
C 07 K	15/12		7731-4H
	15/28		7731-4H
C 12 N	15/13	ZNA	
// A 61 K	39/395	ADY	S 8829-4C
G 01 N	33/569		H 9015-2J
	33/577		B 9015-2J
(C 12 P	21/08		
C 12 R	1:91)		